

線虫を用いたスクリーニングによるタンパク質対称型アルギニンジメチル化酵素の同定に関する研究

著者	狩野 明彦
発行年	2017
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2016
報告番号	12102甲第8152号
URL	http://hdl.handle.net/2241/00147841

氏名	狩野 明彦
学位の種類	博 士（農学）
学位記番号	博 甲 第 8152 号
学位授与年月日	平成 29年 3月 24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	生命環境科学研究科
学位論文題目	線虫を用いたスクリーニングによるタンパク質対称型アルギニンジメチル化酵素の同定に関する研究
主査	筑波大学教授 農学博士 深水 昭吉
副査	筑波大学准教授 博士（薬学） 木村 圭志
副査	筑波大学講師 博士（学術） 加香孝一郎
副査	筑波大学助教 博士（農学） 廣田 恵子

論 文 の 要 旨

タンパク質の翻訳後修飾は分子間相互作用や活性調節を制御しているが、塩基性アミノ酸残基のメチル化は、細胞応答やエピゲノムの調節に重要な修飾として注目されている。具体的には、リジン側鎖では ϵ -アミノ基のモノ、ジ、トリメチル化が、ヒスチジン側鎖ではイミダゾール環窒素原子のメチル化がそれぞれ生じるが、アルギニンの側鎖に対しては、グアニジド基末端の片方の窒素原子にメチル基が1つ付加したモノメチルアルギニン（MMA）、末端の片方の窒素原子にメチル基が2つ付加した非対称型ジメチルアルギニン（ADMA）、そして末端の窒素原子の両方にメチル基が一つずつ付加した対称型ジメチルアルギニン（SDMA）が生成される。タンパク質メチル化酵素に関しては、従来 *in vitro* での活性研究が中心であり、多細胞生物の *in vivo* の酵素活性は、唯一 ADMA を形成する線虫のタンパク質アルギニンメチル基転移酵素-1（PRMT-1）で報告されたのみであった。

まず、審査対象論文では、著者は線虫を用いた個体内活性を指標にしたタンパク質メチル化酵素のスクリーニングについて記述した。メチル基転移酵素に共通した2次構造をもとに、線虫のゲノムデータベースより選別し、メチル化酵素遺伝子ライブラリーを構築した。次いで、線虫の餌となる大腸菌体内で dsRNA として発現させ、feeding 法により線虫内在の特定のメチル化酵素遺伝子をノックダウンして発現を抑制した。回収した線虫から全タンパク質の加水分解物を調製し、特異的に減少するメチル化アミノ酸を LC-MS/MS を用いて定量する方法で、タンパク質メチル基転移酵素遺伝子を探索した。230 個のメチル化酵素候補遺伝子をスクリーニングした結果、ADMA と SDMA の生成にそれぞれ寄与

する候補遺伝子として *prmt-1* と *prmt-5* を単離に成功した。

次いで著者は、*prmt-1* と *prmt-5* の各遺伝子欠損変異体の線虫内のメチル化アルギニンを測定し、*prmt-1* 遺伝子欠損変異体では ADMA が消失するばかりでなく、MMA も有意に減少することを証明した。さらに、*prmt-5* 遺伝子欠損変異体を分析したところ、ADMA や MMA には変化が無いのに対し、SDMA のみが消失することを見出した。さらに *prmt-1* 遺伝子欠損変異体に対して、線虫で知られている *prmt* ファミリーメンバーを個々にノックダウンしたところ、*prmt-7* のノックダウンで有意な MMA の減少が観測された。これらの結果は、PRMT-1 が ADMA のみならず MMA の生成にも寄与していること、また PRMT-5 が生体内における主要な SDMA の生成酵素であること、さらに PRMT-7 も MMA の生成に関与しうることを示しており、タンパク質アルギニンメチル基転移酵素の生理機能の解明に向けた有意義な成果であると思われる。

審 査 の 要 旨

メチル基転移酵素に関する先行研究の多くでは、精製酵素とモデル基質を用いた *in vitro* の手法や、細胞と抗メチル化基質抗体を用いた実験によって、特定の基質に対するメチル化活性を評価している。哺乳類のアルギニンメチル化酵素である PRMT1 や PRMT5 も *in vitro* の生化学的手法で多数の酵素・基質間の研究が進展してきたが、これらの遺伝子欠損マウスは発生早期に胎生致死となることから、生体内における酵素活性の詳細は不明であった。既に PRMT-1 が線虫の主要なアルギニン残基の非対称ジメチル化酵素であることは示されていたが、著者は初めて PRMT-1 が生体内で MMA 生成に寄与していることと、PRMT-5 が線虫の主要な SDMA 生成酵素であることを明らかにした。また、*prmt* 遺伝子は多細胞生物に広く保存された遺伝子であることから、哺乳類を含めた他の生物種でも類似の活性特異性を有する可能性が考えられ、タンパク質アルギニンメチル化酵素の生理的触媒作用を明らかにしたという点で、画期的な成果であると言える。

一方、本研究ではアルギニン以外のアミノ酸残基のメチル化酵素の同定には至っていない。本研究で用いられている塩基性アミノ酸側鎖のメチル化が酸加水分解に抵抗性を示すという利点を活かした手法は、個体総タンパク質中のメチルアミノ酸量の減少をスクリーニングの指標としているために、多数の酵素によって様々な基質に同一メチルアミノ酸（メチルリジン等）が生成する場合は検出されにくいことが原因の一つとなっていると考察していた。これを克服するために、例えば組織や細胞画分などに分けて基質をグループ化し、グループ毎にメチル化酵素活性を検討することで、アルギニン以外のメチル基転移酵素の同定にアプローチできる可能性が考えられる。本研究で得られた上記の知見は、今後更なるタンパク質メチル化機構の解明に貢献することが期待される。

平成 29 年 1 月 16 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員の出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有する者として認める。